

JP04/70
日本国特許庁 PCT/JP2004/000070
JAPAN PATENT OFFICE

08.1.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

REC'D 27 FEB 2004

WIPO

PCT

出願年月日 2003年 1月14日
Date of Application:

出願番号 特願2003-006005
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2003-006005]

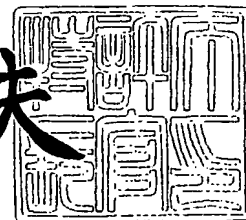
出願人 辻 彰
Applicant(s): 大塚製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-300895

【書類名】 特許願

【整理番号】 86502JP

【提出日】 平成15年 1月14日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/00

【発明者】

 【住所又は居所】 石川県金沢市長町 1 - 3 - 1 0

 【氏名】 辻 彰

【発明者】

 【住所又は居所】 石川県金沢市緑ヶ丘 9 - 2 4

 【氏名】 玉井 郁己

【発明者】

 【住所又は居所】 石川県金沢市泉が丘 2 - 9 - 1 7 - 1 0 5 号

 【氏名】 崔 吉道

【発明者】

 【住所又は居所】 徳島県徳島市川内町平石夷野 2 2 4 - 1 8 大塚製薬株式会社 製剤研究所内

 【氏名】 小富 正昭

【発明者】

 【住所又は居所】 徳島県徳島市川内町平石夷野 2 2 4 - 1 8 大塚製薬株式会社 製剤研究所内

 【氏名】 豊福 秀一

【特許出願人】

 【識別番号】 597131521

 【氏名又は名称】 辻 彰

【特許出願人】

 【識別番号】 000206956

 【氏名又は名称】 大塚製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100065215

【弁理士】

【氏名又は名称】 三枝 英二

【電話番号】 06-6203-0941

【選任した代理人】

【識別番号】 100076510

【弁理士】

【氏名又は名称】 掛樋 悠路

【選任した代理人】

【識別番号】 100086427

【弁理士】

【氏名又は名称】 小原 健志

【選任した代理人】

【識別番号】 100090066

【弁理士】

【氏名又は名称】 中川 博司

【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

【弁理士】

【氏名又は名称】 舘 泰光

【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治

【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 睦子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9708032

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プロトン駆動型トランスポーター介在型消化管吸収改善剤及びその製法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物と、該プロトン駆動型トランスポーターにおける該化合物の消化管内での至適細胞内取り込み pH とするのに足る量の pH 感受性高分子とを含む、消化管での吸収性が良好な製剤。

【請求項 2】 プロトン駆動型トランスポーターが、小腸の上皮細胞に発現する吸収輸送系トランスポーターである請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 3】 プロトン駆動型トランスポーターが、ペプチドトランスポーター、モノカルボン酸トランスポーター、又は D-サイクロセリンを輸送するアミノ酸トランスポーターである請求項 2 に記載の製剤。

【請求項 4】 プロトン駆動型トランスポーターが、ペプチドトランスポーターである請求項 3 に記載の製剤。

【請求項 5】 ペプチドトランスポーターに認識される化合物が、ペプチド、 β -ラクタム抗生物質、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、抗ウイルス薬、抗腫瘍薬、 ω -アミノカルボン酸からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである請求項 4 に記載の製剤。

【請求項 6】 プロトン駆動型トランスポーターが、モノカルボン酸トランスポーターである請求項 3 に記載の製剤。

【請求項 7】 モノカルボン酸トランスポーターに認識される化合物が、乳酸、ピルビン酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、グリコール酸、ニコチン酸、サリチル酸、安息香酸、パラアミノ安息香酸及びホスカルネットからなる群から選ばれる少なくとも 1 つである請求項 6 に記載の製剤。

【請求項 8】 プロトン駆動型トランスポーターが、D-サイクロセリンを輸送するアミノ酸トランスポーターである請求項 3 に記載の製剤。

【請求項 9】 D-サイクロセリンを輸送するアミノ酸トランスポーターに認識される化合物が、L-アラニン、 β -アラニン、L-プロリン及びグリシンから

なる群から選ばれる少なくとも1つである請求項8に記載の製剤。

【請求項10】 プロトン駆動型トランスポーターにおける至適細胞内取り込みpHが、該プロトン駆動型トランスポーターを発現した細胞を使用し、各種pH条件における基質の細胞内取り込み量を評価して測定されたものである請求項1に記載の製剤。

【請求項11】 pH条件における基質の細胞内取り込み量の評価方法が、腸管におけるイン シチュ クローズド ループ法を用いたものである請求項10に記載の製剤。

【請求項12】 pH感受性高分子が、乾燥メタクリル酸コポリマー、メタクリル酸コポリマーLD、メタクリル酸コポリマーL、メタクリル酸コポリマーS、ポリアクリル酸、マレイン酸-n-アルキルビニルエーテル共重合体、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、及びヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートからなる群から選ばれる少なくとも1つである請求項1に記載の製剤。

【請求項13】 pH感受性高分子が、オイドラギットL100-55、オイドラギット 30D-55、オイドラギット L100、オイドラギット S100、オイドラギットP-4135F、ポリアクリル酸、マレイン酸-n-アルキルビニルエーテル共重合体、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、及びヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートからなる群から選ばれる少なくとも1つである請求項1に記載の製剤。

【請求項14】 請求項1～13のいずれかに記載の経口投与用製剤。

【請求項15】 下記の(1)及び(2)の工程を含む消化管での吸収性が良好な製剤の製法：

- (1) プロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物の該プロトン駆動型トランスポーターにおける至適細胞内取り込みpHを測定する工程、及び
- (2) 上記至適細胞内取り込みpHとするのに足る量のpH感受性高分子を該化合物に配合する工程。

【請求項16】 請求項15に記載の製法により得られる製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、プロトン駆動型トランスポーター介在型消化管吸収改善剤及びその製法に関する。

【0002】

【従来の技術】

一般に多くの慢性疾患領域において、経口投与法は、利便性もしくはコストの点から望ましい投与経路であると考えられている。

【0003】

しかしながら、多くの医薬品候補化合物は、消化管における膜透過性が低いもしくは消化管内において不安定であるため経口での吸収性が低下し、十分な薬理効果を得る血中濃度を維持できないという現状に直面する。

【0004】

また、小腸上皮細胞に発現する吸収輸送系トランスポーターに認識されることが報告されているにもかかわらず、難吸収性を示す傾向のある有機化合物があることも知られている（例えば、非特許文献1及び2）。

【0005】

このような状況の中で、医薬品候補化合物の吸収改善に種々の吸収促進剤もしくは酵素阻害剤を利用することが検討されている。

【0006】

例えば、非特許文献3及び4には、ペプチドの吸収改善のために吸収促進剤を利用する方法が記載されている。しかし、この方法は、本来吸収を促進するために添加する吸収促進剤により細胞が障害を受けるという問題点がある。

【0007】

一方、非特許文献5及び6には、消化管における分解を抑制し吸収をさせる目的で、酵素阻害剤を添加する方法が記載されている。しかし、この方法を用いた場合には、吸収に特異性が得られないといった問題点がある。

【0008】

また、消化管における排出輸送系に認識されるフロセミドの吸収を改善するた

めに、pH感受性高分子を添加するなどの方法も知られているが（例えば、非特許文献7）、トランスポーターを利用した消化管吸収の改善を示唆するものではなく、上記と同様、消化管吸収に特異性は得られないといった問題点がある。

【0009】

また、従来、吸収輸送系トランスポーターの基質でありながら難吸収性を示す有機化合物の吸収を促進させた例はない。

【0010】

【非特許文献1】

Sakamoto et al., J. Antibiot. 38: 496-504 (1985)

【0011】

【非特許文献2】

Kelly et al., Clin. Pharmacokinet. 19:177-196 (1990)

【0012】

【非特許文献3】

Swenson et al., Adv. Drug. Del. Rev. 8: 39-92 (1992)

【0013】

【非特許文献4】

Kompella et al., Adv. Drug. Del. Rev. 46: 211-245 (2001)

【0014】

【非特許文献5】

Hayakawa et al., Pharm. Res. 9: 535-540 (1992)

【0015】

【非特許文献6】

Zhou et al., J. Control. Rel. 29: 239-252 (1994)

【0016】

【非特許文献7】

Terao et al., J. Pharm. Pharmacol. 53: 433-440 (2000)

【0017】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、医薬品化合物の細胞内への吸収を改善し、経口投与等において十分な治療効果が期待できる血中濃度が得られる医薬製剤、及びその製法を提供することにある。具体的には、プロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物と該プロトン駆動型トランスポーターにおいて該化合物の至適細胞内取り込み pH とするのに足る量の pH 感受性高分子とを含む、消化管での吸収性が良好な製剤及びその製法を提供することにある。

【0018】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、以下の新規な知見(1)及び(2)を見出し、これを更に発展させて本発明を完成するに至った：

(1) ペプチドトランスポーター（プロトン駆動型ペプチドトランスポーターの1つ）で認識される化合物（以下「基質」ともいう）が消化管で難吸収性の傾向を示す場合があるのは、ペプチドトランスポーターの基質輸送駆動力であるプロトン（ H^+ ）が消化管下部にいくにつれて減少し基質輸送能力が低下するためであること、及び

(2) 特定の pH 感受性高分子を添加することによりペプチドトランスポーターの駆動力が向上し、難吸収性傾向を示すペプチドトランスポーター認識化合物の消化管からの吸収性が改善されること。

【0019】

すなわち、本発明は以下の技術を提供する。

項1 プロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物と、該プロトン駆動型トランスポーターにおける該化合物の消化管内での至適細胞内取り込み pH とするのに足る量の pH 感受性高分子とを含む、消化管での吸収性が良好な製剤。

項2 プロトン駆動型トランスポーターが、小腸の上皮細胞に発現する吸収輸送系トランスポーターである項1に記載の製剤。

項3 プロトン駆動型トランスポーターが、ペプチドトランスポーター、モノカルボン酸トランスポーター、又はD-サイクロセリンを輸送するアミノ酸トランスポーターである項2に記載の製剤。

項4 プロトン駆動型トランスポーターが、ペプチドトランスポーターである項

3 に記載の製剤。

項 5 ペプチドトランスポーターに認識される化合物が、ペプチド、 β -ラクタム抗生物質、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、抗ウイルス薬、抗腫瘍薬、 ω -アミノカルボン酸からなる群から選ばれる少なくとも 1 つである項 4 に記載の製剤。

項 6 プロトン駆動型トランスポーターが、モノカルボン酸トランスポーターである項 3 に記載の製剤。

項 7 モノカルボン酸トランスポーターに認識される化合物が、乳酸、ピルビン酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、グリコール酸、ニコチン酸、サリチル酸、安息香酸、パラアミノ安息香酸及びホスカルネットからなる群から選ばれる少なくとも 1 つである項 6 に記載の製剤。

項 8 プロトン駆動型トランスポーターが、D-サイクロセリンを輸送するアミノ酸トランスポーターである項 3 に記載の製剤。

項 9 D-サイクロセリンを輸送するアミノ酸トランスポーターに認識される化合物が、L-アラニン、 β -アラニン、L-プロリン及びグリシンからなる群から選ばれる少なくとも 1 つである項 8 に記載の製剤。

項 10 プロトン駆動型トランスポーターにおける至適細胞内取り込み pH が、該プロトン駆動型トランスポーターを発現した細胞を使用し、各種 pH 条件における基質の細胞内取り込み量を評価して測定されたものである項 1 に記載の製剤。

項 11 pH 条件における基質の細胞内取り込み量の評価方法が、腸管におけるイン シチュ クローズド ループ法を用いたものである項 10 に記載の製剤。

項 12 pH 感受性高分子が、乾燥メタクリル酸コポリマー、メタアクリル酸コポリマー-LD、メタアクリル酸コポリマー-L、メタアクリル酸コポリマー-S、ポリアクリル酸、マレイン酸-n-アルキルビニルエーテル共重合体、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、及びヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートからなる群から選ばれる少なくとも 1 つである項 1 に記載の製剤。

項 13 pH 感受性高分子が、オイドラギット L100-55、オイドラギット 30D-55

、オイドラギット L100、オイドラギット S100、オイドラギット P-4135F、ポリ
アクリル酸、マレイン酸-n-アルキルビニルエーテル共重合体、ヒドロキシプロ
ピルメチルセルロースアセテートサクシネート、及びヒドロキシプロピルメチル
セルロースフタレートからなる群から選ばれる少なくとも 1 つである項 1 に記載
の製剤。

項 14 項 1～13 のいずれかに記載の経口投与用製剤。

項 15 下記の(1)及び(2)の工程を含む消化管での吸収性が良好な製剤の製法:

(1) プロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物の該プロトン駆動型ト
ランスポーターにおける至適細胞内取り込み pH を測定する工程、及び

(2) 上記至適細胞内取り込み pH とするのに足る量の pH 感受性高分子を該化合
物に配合する工程。

項 16 項 15 に記載の製法により得られる製剤。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明について以下詳細に説明する。

プロトン駆動型トランスポーター

本発明におけるプロトン駆動型トランスポーターとは、消化管から細胞内に向
けてプロトン (H⁺) 勾配を利用し濃度勾配に逆らった輸送を行う能動輸送型の
トランスポーターをいう。プロトン駆動型トランスポーターは、消化管、具体的
には小腸上皮細胞刷子縁膜等に発現しており、細胞内に栄養物質や薬物を細胞内
に取り込む吸収輸送型のトランスポーターである。上記の小腸には、十二指腸、
空腸、回腸が含まれる。

【0021】

本発明におけるプロトン駆動型トランスポーターの具体例としては、ペプチド
トランスポーター (PEPT)、モノカルボン酸トランスポーター、D-サイク
ロセリンを輸送するアミノ酸トランスポーター等が挙げられる。

【0022】

上記ペプチドトランスポーター (PEPT) は、ジペプチド、トリペプチド、
それらの類似化合物の輸送を媒介するトランスポーターであり、生体における蛋

白質の吸収やペプチド性窒素源の維持に寄与する。具体的には、710個のアミノ酸からなり主に小腸や腎臓に発現しているペプチドトランスポーター1（PEPT1）、及び729個のアミノ酸からなり主に腎臓や、脳、肺、脾臓等に発現しているペプチドトランスポーター2（PEPT2）が挙げられる。

【0023】

なお、上記の吸収輸送型ペプチドトランスポーターにより小腸上皮細胞内に取り込まれた化合物は、小腸上皮細胞の側底膜に存在する側底膜型ペプチドトランスポーターにより血中に輸送される。側底膜型ペプチドトランスポーターは、濃度勾配に従った輸送を媒介する促進拡散型のトランスポーターである。

【0024】

上記モノカルボン酸トランスポーターは、乳酸の輸送を媒介するトランスポーターであり、生体における嫌氣的解糖の最終生成物である乳酸の維持に寄与する。

【0025】

上記D-サイクロセリンを輸送するアミノ酸トランスポーターは、アミノ酸の輸送を媒介するトランスポーターであり、生体におけるアミノ酸の維持に寄与する。

プロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物

本発明におけるプロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物とは、プロトン駆動型トランスポーターに認識され消化管から細胞内に取り込まれ得る化合物をいう。プロトン駆動型トランスポーターに認識されるか否かは、例えば次のようにして判定される。

【0026】

対象となるプロトン駆動型トランスポーターが発現している細胞及び発現していない細胞を使用して、化合物の細胞内取り込み量を測定する。プロトン駆動型トランスポーターが発現している細胞とは、内因的にプロトン駆動型トランスポーターを発現している細胞を意味する。例えば、内因的にペプチドトランスポーターを発現している細胞として、Caco-2細胞、HT-29細胞、COLO-320細胞、HT-10

80細胞、AsPc-1細胞、Capan-2細胞およびSK-ChA-1等が挙げられる。プロトン駆動型トランスポーターが発現している細胞で取り込みが高い場合には、化合物の細胞内移行にプロトン駆動型トランスポーターが関与することが考えられる。

【0027】

さらに、取り込みが観察された細胞を使用し、プロトン駆動型トランスポーターに認識されることが既に判っている基質を同時に添加し、細胞内取り込みを評価したときに、化合物の細胞内取り込み阻害効果が観察されれば、評価した化合物はプロトン駆動型トランスポーターに認識されると判定される（例えば、実施例5を参照）。

【0028】

或いは、プロトン駆動型トランスポーターが発現している細胞は、例えば、PEPT1 cDNAを哺乳類培養細胞発現ベクターに組み込み、モデル細胞（例えば、HeLa細胞）に過剰発現させる等の公知の方法により作製し、化合物の細胞内取り込み量を測定してもよい。

【0029】

細胞内取り込み量の測定は、プロトン駆動型トランスポーターを発現している細胞及び発現していない細胞における、単位細胞タンパク質重量あたりの細胞内移行量を評価して判定される。例えば、ペプチドトランスポーターの場合は、単位細胞タンパク質重量あたりの細胞内移行量（ $\mu\text{L}/\text{mg protein}$ ）を評価して判定される。

【0030】

プロトン駆動型トランスポーターのうち上記のペプチドトランスポーター（PEPT）は、構成アミノ酸による基質選択性が低いため、他の栄養物質トランスポーターに比べて広範な基質認識性を有している。PEPT（特に、PEPT1）において認識され小腸上皮細胞内に取り込まれる化合物としては、ペプチドのみならず、 β -ラクタム抗生物質、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、抗ウイルス薬、抗腫瘍薬、 ω -アミノカルボン酸等の広範な医薬化合物が挙げられる。

【0031】

具体的には、ペプチドとしては、ジペプチド、トリペプチドが挙げられる。ジ

ペプチドとしては、天然又は合成アミノ酸から選ばれる任意の2つのアミノ酸をアミド結合して得られるものであればよく、そのうち好ましいものとしてはグリシルサルコシン、カルノシン、リジノプリル等が例示される。トリペプチドとしては、天然又は合成アミノ酸から選ばれる任意の3つのアミノ酸をアミド結合して得られるものであればよく、そのうち好ましいものとしてはPhe-Cys-Val、Glu-His-Pro、Phe-Ala-Proが例示される。

【0032】

β -ラクタム抗生物質としては、例えば、ペニシリン系、セフェム系抗生物質等が挙げられ、具体的には、アモキシリン、アンピシリン、シクラシリン、フェノキシメチルペニシリン (phenoxy-methylpenicillin)、プロピシリン、カルフェシリン (carfecillin)、カルベニシリン (carbenicillin)、バカムピシリン (bacampicillin)、ピバムピシリン (pivampicillin)、セファドロキシル、セフィキシム、セフチブテン、セファクロル、セファレキシン、セファラジン、SCE-100、セファトリジン、セファロチン、セフジニル、ロラカロベフ (loracarobef)、FK089、ラタモキセフ (latamoxef)、ピブセファレキシン (pivcefalexine)、セファゾリン、セフォペラゾン、セフォキシチン、セフォチアム、セフメタゾール等が例示される。

【0033】

アンジオテンシン変換酵素阻害剤としては、カプトプリル、エナラプリル、キナプリル、ベナゼプリル (benazepril)、フォシノプリル (fosinopril)、リシノプリル (lisinopril)、SQ 29852、エナラプリラート、キナプリラート、ベナゼプリラート (benazeprilat)、フォシノプリラート (fosinoprilat) 等が例示される。

【0034】

抗ウイルス薬としては、バラシクロビル等が例示される。

【0035】

抗腫瘍薬としては、ベスタチン等が例示される。

【0036】

ω -アミノカルボン酸としては、一般式[1]：



(式中、 n は4～11の整数を示す)

で示される化合物が挙げられる。

【0037】

この他にも、L-ドーパ-L-フェニルアラニン (L-dopa-L-Phe)、4-アミノフェニル酢酸 (4-aminophenyl acetic acid (4-APAA))、 δ -アミノレブリン酸 (δ -aminolevulinic acid (ALA)) 等が例示される。

【0038】

プロトン駆動型トランスポーターのうち上記のモノカルボン酸トランスポーターにおいて認識され細胞内に取り込まれる化合物としては、乳酸、ピルビン酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、グリコール酸、ニコチン酸、サリチル酸、安息香酸、パラアミノ安息香酸及びホスカルネット等の化合物が挙げられる。

【0039】

プロトン駆動型トランスポーターのうち上記のD-サイクロセリンを輸送するアミノ酸トランスポーターにおいて認識され細胞内に取り込まれる化合物としては、L-アラニン、 β -アラニン、L-プロリン及びグリシン等の化合物が挙げられる。

プロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物のpHプロファイル

本発明において、プロトン駆動型トランスポーターでの各種pHにおける基質の細胞内取り込み量（いわゆる「pHプロファイル」）の測定は、次のようにして行われる。該プロトン駆動型トランスポーターを発現した細胞を使用し、in vitro条件下にて各種pH条件下における基質の細胞内取り込み量を評価して測定する。

【0040】

例えば、PEPT1における各基質のpHプロファイルは、消化管モデル細胞であるヒト大腸ガン由来Caco-2細胞等のPEPT1を発現した細胞を使用し、in vitro条件下にて各種pH条件下における基質の細胞内取り込み量を測定する。

【0041】

具体的な測定方法は、報告された方法 (Tsuji A, Takanaga H, Tamai I, Terasaki T. Transcellular transport of benzoic acid across Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier-mediated transport mechanism. Pharm Res, 11: 30-37 (1994)) に従って行われる (例えば、実施例 1 を参照)。

【0042】

或いは、ラット消化管ループを用いて測定することも可能である (イン シチュ クローズド ループ 法 (in situ closed loop method))。ラット消化管ループを使用する場合には、以下の文献記載の方法を参考にして行われる。Barr WH, Riegelman S. Intestinal drug absorption and metabolism. I. Comparison of methods and models to study physiological factors of in vitro and in vivo intestinal absorption. J Pharm Sci, 59: 154-163 (1970)。吉富博則, 基本的な消化管吸収実験, 「生物薬剤学実験マニュアル」, 後藤 茂 (編), 清至書院, 東京, 2-22 (1985)。

【0043】

例えば、ラットをペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) 腹腔内投与により麻酔する。その後、正中線に沿って開腹し、腸管を露出させる。回腸にループを作製する。薬液及び高分子を含むMES buffer (5 mM KCl, 100 mM NaCl, 10 mM 2-(N-モルホリノ) エタンスルホン酸 (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) (MES), 85 mM マンニトール (mannitol), ポリエチレングリコール (polyethylene glycol) 0.01%; pH 6.0; 浸透圧 290 mOsm/kg) を腸管ループ内に入れ両端を結紮する。その後、直ちに腸管ループを腹腔内に戻し、白熱ランプを使用して体温を維持する。投与20分後、腸管ループ内溶液を回収し、pH及び薬物量をHPLCにより測定する。

【0044】

In vitro条件下における細胞内移行性は、in vivo消化管における膜透過性を評価する指標となりうる。生理的条件下での消化管のpHは通常ヒトで5.4～7.5と報告されているので (Davies B. and Morris T., Physiological parameters in laboratory animals and humans, Pharm. Res. 10: 1093-1095 (1993))、実際にはin vivoでの消化管からの吸収はこの条件に支配されるものと考えら

れる。

【0045】

或いは、PEPT1における各基質のpHプロファイルは、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞 (*X. laevis* Oocyte) にcRNA hPEPT1を注入し、卵母細胞への取り込みを測定する。また、電気生理学的手法により、ペプチドトランスポーターの基質を添加した時の電位差を検出して測定する。

【0046】

具体的には、Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, Singh SK, Boron WF, Hediger MA. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*, 368: 563-566 (1994) に記載の方法に準じて測定する。

【0047】

一般に、基質の至適取り込みpHは、対象とするプロトン駆動型トランスポーター及びその基質の種類により変動する。しかし、上記の手法を用いて測定されるpHプロファイルにより、プロトン駆動型トランスポーターにおける各pHでの基質の細胞内取り込み量が明らかとなり、プロトン駆動型トランスポーターにおける基質の「至適細胞内取り込みpH」が求められる。

pH感受性高分子

本発明で用いられるpH感受性高分子とは、生体内における特定部位（例えば、消化管）のpHを検知してプロトンを放出し、溶解もしくは膨潤する高分子をいう。具体的には、乾燥メタクリル酸コポリマー、メタクリル酸コポリマーLD、メタクリル酸コポリマーL、メタクリル酸コポリマーS、ポリアクリル酸、マレイン酸-n-アルキルビニルエーテル共重合体、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等が例示される。より具体的には、オイドラギット (Eudragit) (登録商標、以下同じ) L100-55、オイドラギット 30D-55、オイドラギット L100、オイドラギット S100、オイドラギットP-4135F等が例示される。これらは、いずれも市販されているもの又は公知の方法で製造できるものを採用することができる。

【0048】

これらの pH 感受性高分子のうち、本発明の製剤に好適に用いられるものとしては、例えば、オイドラギット L100-55、オイドラギット L100、オイドラギット S100、オイドラギット P-4135F 等が挙げられ、より好ましくはオイドラギット L100-55、オイドラギット L100 である。

製剤

本発明の製剤は、上述のプロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物の pH プロファイルに基づき、消化管内における至適細胞内取り込み pH とするのに足る量の pH 感受性高分子を配合して調製される。上記の消化管内とは、小腸内のことを意味し、具体的には、プロトン駆動型トランスポーターが発現する小腸上皮細胞刷子縁膜側近傍を意味する。

【0049】

例えば、実験により、設定する基質吸収量に応じて、配合する pH 感受性高分子を求める。配合する pH 感受性高分子は、設定する基質に対して添加量を変化させ、In situ closed loop 法もしくはラットへの経口投与試験法により求める。

【0050】

本発明の製剤における pH 感受性高分子の配合量は、プロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物の特性により変化するが、例えば、プロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物 1 重量部に対し、1～1000 重量部程度、好ましくは 50～500 重量部程度を配合すればよい。

【0051】

或いは、pH 感受性高分子の配合量は、製剤全体の重量に対し、5～40 重量%程度配合されていてもよい。

【0052】

プロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物と pH 感受性高分子を含む本発明の製剤の好ましい配合形態としては、例えば、ジペプチドとメタクリル酸コポリマーを配合したもの、 β -ラクタム抗生物質とメタクリル酸コポリマーを配合したもの等が挙げられる。

【0053】

ジペプチドとメタクリル酸コポリマーを配合したもののうち、ジペプチドの具体例としては、グリシルサルコシン、カルノシン、リジノプリル等が挙げられ、メタクリル酸コポリマーの具体例としては、乾燥メタクリル酸コポリマー（例えば、オイドラギットL100-55）、メタアクリル酸コポリマーLD（例えば、オイドラギット30D-55）、メタアクリル酸コポリマーL（例えば、オイドラギットL100）、メタアクリル酸コポリマーS（例えば、オイドラギットS100）等が挙げられる。より好ましい配合形態としては、グリシルサルコシン又はカルノシンとオイドラギットL100-55とを配合したものが挙げられる。

【0054】

β -ラクタム抗生物質とメタクリル酸コポリマーを配合したもののうち、 β -ラクタム抗生物質としては、ペニシリン系、セフェム系抗生物質等が挙げられ、その具体例としては、セファドロキシル、セフィキシム、セフチブテン、FK089、アモキシリン、アンピシリン、シクラシリン、フェノキシメチルペニシリン、プロピシリン、カルフェシリン、カルベニシリン、バカムピシリン、ピバムピシリン、セファドロキシル、セフィキシム、セフチブテン、セファクロル、セファレキシン、セファラジン、SCE-100、セファトリジン、セファロチン、セフジニル、ロラカロベフ、FK089、ラタモキセフ、ピブセファレキシン、セファゾリン、セフォペラゾン、セフォキシチン、セフォチアム、セフメタゾール等が挙げられる。メタクリル酸コポリマーの具体例としては、上述のものが挙げられる。より好ましい配合形態としては、セファドロキシル、セフィキシム又はFK089とオイドラギットL100-55とを配合したものの等が挙げられる。

【0055】

本発明の製剤は、そのまま経口投与用の散剤として用いることができるが、さらに種々の方法により製剤化し投与することも可能である。例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注腸剤として用いることもできる。これらの製剤中には、必要に応じて製剤上知られる賦形剤、崩壊剤、滑沢剤等の種々の添加剤を配合することができる。特に、消化管全域に渡って薬物及びpH感受性高分子を送達することが可能な、腸溶性の徐放化製剤等とするのが好ましい。或いは、pH感

受性高分子と薬剤を含む液状の製剤（液剤、懸濁剤、シロップ剤など）としてもよく、これにより、水分含量の点で通常の錠剤と比較して、消化管全域に渡って薬物及びpH感受性高分子を送達することが可能となる。これらの製剤は、いずれも公知の方法に従い製造することが可能である。

【0056】

本発明の製剤によれば、共存するpH感受性高分子により消化管内が至適細胞内取り込みpHに制御されるため、消化管内においてプロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物の吸収性が向上する。特に、本発明の製剤によれば、プロトンが減少する消化管下部（回腸など）においても、至適細胞内取り込みpHを維持する適量のpH感受性高分子が配合されているため、プロトン駆動型トランスポーターの輸送能力が低下せず高い薬物吸収性を示すという特徴を有している。そのため、本発明の製剤は、経口投与においても十分な薬物血中濃度を得ることができ、高いバイオアベイラビリティが達成される。

【0057】

【実施例】

次に、実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0058】

【実施例1】

PEPT1によるジペプチド及び β -ラクタム抗生物質の至適細胞内取り込みに対して細胞外液が影響を及ぼすかどうかを明らかにするため、消化管モデル細胞Caco-2細胞を用いて、ジペプチドである $[^{14}\text{C}]$ グリシルサルコシン(Glycylsarcosine) ($[^{14}\text{C}]$ GlySar)及び $[^3\text{H}]$ カルノシン(carnosine)、及び β -ラクタム抗生物質であるセファドロキシル(cefadroxil) (CDX)、セフィキシム(cefixime) (CFIX)及びFK089について、それらのpH 5.0 ~ pH 7.0における細胞内取り込みを評価した。

【0059】

4穴プレートに培養した細胞を37°Cに加温したHanks' -balanced salt solution (HBSS) (0.952 mM CaCl_2 , 5.36 mM KCl , 0.441 mM KH_2PO_4 , 0.812 mM MgSO_4

, 136.7 mM NaCl, 0.385 mM Na₂HPO₄, 25 mM D-glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4; 浸透圧 315 mOsm/kg) 1 mLで3回洗浄し、薬液を含むHBSS 250 μ Lを添加し取り込みを開始する。一定時間後に氷冷したHBSS 1 mLで3回洗浄することで取り込みを終了させる。取り込み終了後、5 N NaOH 0.25 mLを加えて2時間振盪して細胞を可溶化し、5 N HCl 0.25 mLで中和し、細胞抽出液に含有される薬物量を、液体シンチレーションカウンターもしくは液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量する。細胞の蛋白量は、Bradford法に従い、Protein Assay Kit (Bio-Rad Richmond, CA, USA)を用いて定量する (Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248-254 (1976))。

【0060】

Caco-2細胞における上記のジペプチド及び β -ラクタム抗生物質の取り込みに及ぼすpHの影響を、図1A及び図1Bに示した。

【0061】

図1Aは、異なるpHにおける、37℃で10 μ M [¹⁴C] GlySar (●) 及び0.15 μ M [³H] カルノシン (▲) のCaco-2細胞による取り込みを測定したものである。各値は3～4の実験の平均±標準誤差を表す。

【0062】

図1Aによれば、[¹⁴C]GlySarの取り込みは明らかにpHに依存し、pH 5.0 ~ pH 6.0で最適な取り込みが観察された。これに対し、弱酸性領域においてはカチオン性を示す[³H] カルノシンの細胞内取り込みは、pH 6.0 ~ 7.0において高いことが示された。すなわち、最適な取り込みを示すpHが[¹⁴C]GlySarと[³H] カルノシンでは異なることが示された。

【0063】

図1Bは、2 mM CFIX (□)、2 mM FK089 (○) 及び2 mM CDX (△) の15分までの取り込みを測定したものである。各値は3～4の実験の平均±標準誤差を表す。

一方、図1Bで示すように、 β -ラクタム抗生物質のCaco-2細胞による最適取り

込みにおいても、顕著なpH依存が示された。細胞外液のpHを6.0から5.0に低下させた時、アニオン性 β -ラクタム抗生物質であるCFIX及びFK089の細胞内取り込みは顕著に増加することが示された。これに対し、生理的pHにおいて両性イオン β -ラクタム抗生物質であるCDXの場合には、pH 6.0において最適な取り込みが観察された。

[実施例 2]

pH感受性高分子の添加によりにpHの制御が可能であるかどうかを明らかにするため、MES 緩衝液のpHに及ぼす高分子の影響について検討を行った。

【0064】

pH感受性高分子としてメタアクリル酸コポリマー オイドラギット L100-55、pH非感受性高分子としてアミノアルキルメタクリレートコポリマー オイドラギット RS P0を用いた。

【0065】

MES 緩衝液 (pH 6.0) に、高分子 (メタアクリル酸コポリマー オイドラギット L100-55 若しくはpH非感受性高分子としてアミノアルキルメタクリレートコポリマー オイドラギット RS P0) を添加し、溶液のpHを、pHメーターを使用して測定する。

【0066】

緩衝液のpHは、オイドラギット L100-55の添加濃度に従って低下した (図2)。ポリマー未添加のpHと比較してオイドラギット L100-55の添加濃度が20%の場合には、およそpH 3.0まで低下した。一方、構造内にプロトン解離基を有さないオイドラギット RS P0では、pHの顕著な低下は観察されなかった。

[実施例 3]

β -ラクタム抗生物質の生理的条件下におけるラット消化管からの吸収が、消化管腔内pHをコントロールすることにより改善されるかどうかを明らかにするため、pH感受性高分子 (オイドラギット L100-55) の存在もしくは非存在下における両性化合物CDX及びアニオン性化合物CFIXの吸収を、イン シチュ クローズド

ループ法 (in situ closed loop method) により評価した。

【0067】

β -ラクタム抗生物質(CDX又はCFIX)を10mM ME S緩衝液 (pH 6.0) に、1 mM CDX、0.5 mM CFIXになるように添加し、更にオイドラギットL100-55を全量で10もしくは20%になるように配合し、本発明の経口組成物を調製した。また、対象としてオイドラギットL100-55を含まない β -ラクタム抗生物質溶液をコントロール溶液として調製した。SD系雄性ラットの盲腸接合部 (回腸の終末端と盲腸開始部位との接合部) より胃に向かって14cm離れたところまでに作成した腸管ループに、これらの組成物を投与する。投与後、20分後に腸管ループ内の残存液を回収し、回収液中の β -ラクタム抗生物質濃度をHPLCにより測定した。また、pHメーターを用いて回収液のpHについても測定した。得られた回収液中の β -ラクタム抗生物質濃度を、投与液中濃度より減じることにより吸収性を評価した。

【0068】

図3のAに示すように、オイドラギット L100-55未添加のCDXの吸収率は約40%であった。しかしながら、20%のオイドラギットL100-55を添加した場合には、CDXの吸収率は約80%であり顕著な増加が観察された。さらに、消化管腔内pHは、オイドラギットL100-55の添加により低下した (図3のB)。

【0069】

一方、CFIXはラット回腸からはほとんど吸収されなかった (図3のC)。しかしながらCDXと同様に20%のオイドラギットL100-55の存在により、CFIXの吸収率は約35%と顕著に向上した。また、消化管内液のpHもオイドラギット L100-55の添加により減少した (図3のD)。

[実施例4]

pH感受性高分子を用いて消化管内pHをコントロールすることにより、ペプチド性化合物のラットにおける経口吸収性が改善されるのかどうかを明らかにするため、ペプチド性化合物。CFIXにpH感受性高分子 (オイドラギット L100-55) もしくはpH非感受性高分子 (オイドラギット RS PO) を同時に経口投与し、CFIXの血

漿中濃度推移を評価した。

【0070】

CFIXの0.23mg/mL水溶液に、オイドラギットL100-55を全量で5%になるように配合し、本発明の経口組成物を調製した。また、対象としてオイドラギットL100-55を含まないCFIX溶液をコントロール溶液として調製した。これらの組成物を、一昼夜絶食したSD系雄性ラット（体重：190-220g）に、CFIXの投与量として2.3mg/kgとなるように経口投与した。投与後15分から480分に渡り採血を行い、血漿中CFIX濃度をHPLCにより測定した。得られたCFIX血中濃度プロファイルより、濃度時間曲線下面積（AUC）及び最高血漿中濃度（Cmax）を算出した。

【0071】

図4は、ラットに薬物（2.3mg/kg）を投与後のCFIXの経口投与プロファイルを示したものである。それぞれのプロットは、ポリマー非存在下（○）、オイドラギットL100-55（500mg/kg）存在下（●）、及びオイドラギットRS P0（500mg/kg）存在下（□）のものを示す。各点は5つの実験の平均±標準誤差を表す。

【0072】

図4より、CFIXとpH非感受性オイドラギットRS P0を同時投与した場合には、CFIX単独投与のコントロールと比べて、濃度時間曲線下面積（AUC）、最高血漿中濃度（Cmax）及び最高血漿中濃度時間（Tmax）に有意な差は認められず、CFIXの経口吸収性に変化は観察されなかった（表1）。

【0073】

しかしながら、CFIXとpH感受性酸性オイドラギットL100-55を同時投与した場合には、未添加のコントロールと比較して、AUC及びCmaxが顕著に増加し、CFIXの経口吸収性が顕著に増加した。

【実施例5】

図4でみられたpH感受性酸性高分子によるCFIXの吸収改善効果が、小腸上皮細胞に発現するペプチドトランスポーター（PEPT1）を介在するのかどうかを明ら

かにするため、PEPT1の基質であるCDXを同時投与し、CFIXの経口吸収性に及ぼす影響について検討した（図5、表1）。

【0074】

実験操作は、CDXを同時投与する以外は実施例4と同様にして行った。

【0075】

図5は、ラットに薬物（2.3 mg/kg）を投与後のCFIXの経口投与プロファイルにおけるCDXの影響を評価したものである。それぞれのプロットは、オイドラギットL100-55（500 mg/kg）+CDX 0 mM（●）、オイドラギットL100-55（500 mg/kg）+CDX 2 mM（▲）、及びオイドラギットL100-55（500 mg/kg）+CDX 10 mM（■）のものを示す。各点は5つの実験の平均±標準誤差を表す。

【0076】

図5より、CDX 2 mMを同時投与した場合には、CDXを同時投与しない場合と比較して、CFIXのAUCに有意な差は認められなかったものの、C_{max}は有意に低下した。さらに、CDX 10 mMを同時投与した場合には、CFIXのAUC及びC_{max}は顕著に低下した。

【0077】

以上より、オイドラギット L100-55併用投与によるCFIXの吸収改善効果には、ペプチドトランスポーターによる吸収方向での輸送が関与しているものと考えられる。

図4及び図5における血中濃度推移データから、薬物動態パラメーターを算出した結果を表1にまとめた。

【0078】

【表 1】

サンプル	AUC _{0-8h} (μg·hr/mL)	Cmax (μg/mL)	Tmax (hr)
コントロール	10.81 ± 1.48	4.13 ± 0.50	0.72 ± 0.20
オイドラギット L100-55	27.60 ± 2.39 ^a	11.52 ± 1.86 ^a	1.20 ± 0.20
オイドラギット L100-55 + CDX 2 mM	24.24 ± 4.20	6.39 ± 0.88 ^b	1.00 ± 0.00
オイドラギット L100-55 + CDX 10 mM	11.52 ± 0.99 ^b	3.40 ± 0.60 ^b	1.43 ± 0.20
オイドラギット RS PO	8.83 ± 0.28	3.39 ± 0.16	1.00 ± 0.00

・各データは少なくとも3つの実験の平均±標準誤差を表す

・a p<0.05 における対応するコントロールの値から大きく相違する

・b p<0.05 における対応するオイドラギット L100-55 の値から大きく相違する

【0079】

【発明の効果】

本発明の製剤は、プロトン駆動型トランスポーターがその至適細胞内取り込み pH において基質の取り込みが最も促進されるという新規な知見に基づいて完成されたものである。すなわち、本発明の製剤は、基質のプロトン駆動型トランスポーターにおける至適細胞内取り込み pH に着目し、その pH に適合する量の pH 感受性高分子を配合することによって製造されるものである。

【0080】

そのため、本発明の製剤は、医薬品化合物の消化管での吸収を飛躍的に改善し、経口投与等において十分な治療効果が期待できる高い血中濃度が達成される。

【0081】

また、これまで難吸収性として知られていたプロトン駆動型トランスポーターの基質においても、消化管全域において高い吸収率を達成することができる。

【0082】

従って、本発明の製剤は、経口投与等での治療効果を低用量で有効に向上させることができるという、医薬製剤として優れた特性を有している。

【図面の簡単な説明】

【図 1 A】 Caco-2細胞における、各 pH でのジペプチドの細胞内取り込み

量 (pHプロファイル) を示すグラフである。

【図 1 B】 Caco-2細胞における、各 pHでの β -ラクタム抗生物質の細胞内取り込み量 (pHプロファイル) を示すグラフである。

【図 2】 酸性高分子のMES 緩衝液のpHに及ぼす影響を示すグラフである。

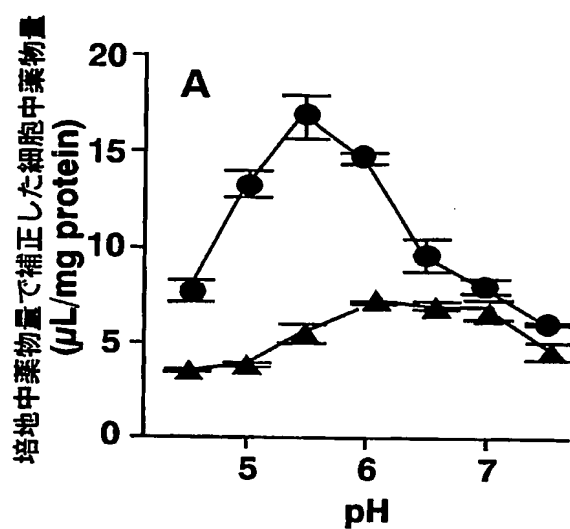
【図 3】 β -ラクタム抗生物質 (CDX又はCFIX) にオイドラギット L100-55を併用投与した場合のラット小腸下部における吸収率及び pHを示すグラフである。

【図 4】 CFIXに高分子を添加しラットに経口投与した場合の血中濃度推移を示すグラフである。

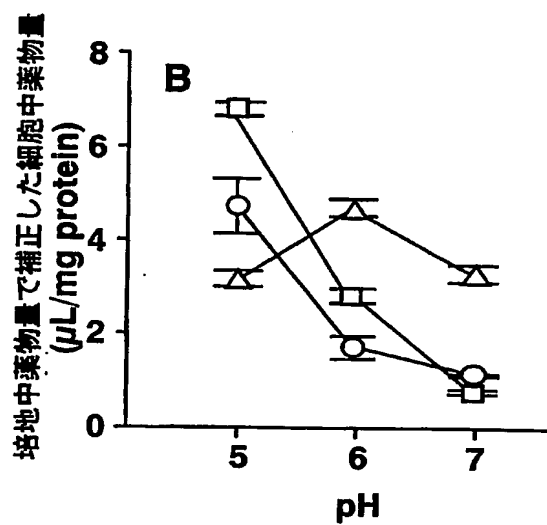
【図 5】 CFIX及びオイドラギット L100-55にCDXを添加しラットに経口投与した場合の、CFIXの血中濃度推移を示すグラフである。

【書類名】 図面

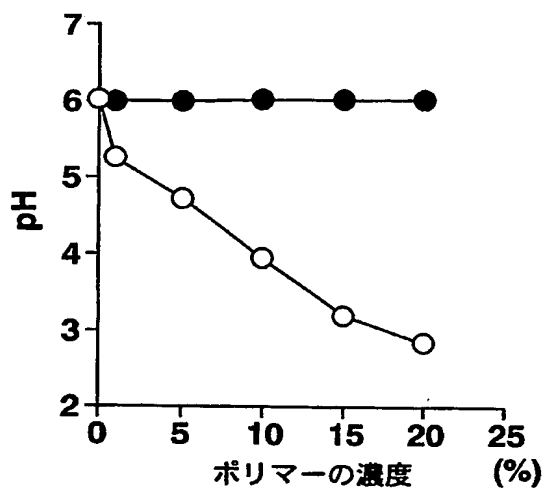
【図1A】



【図1B】

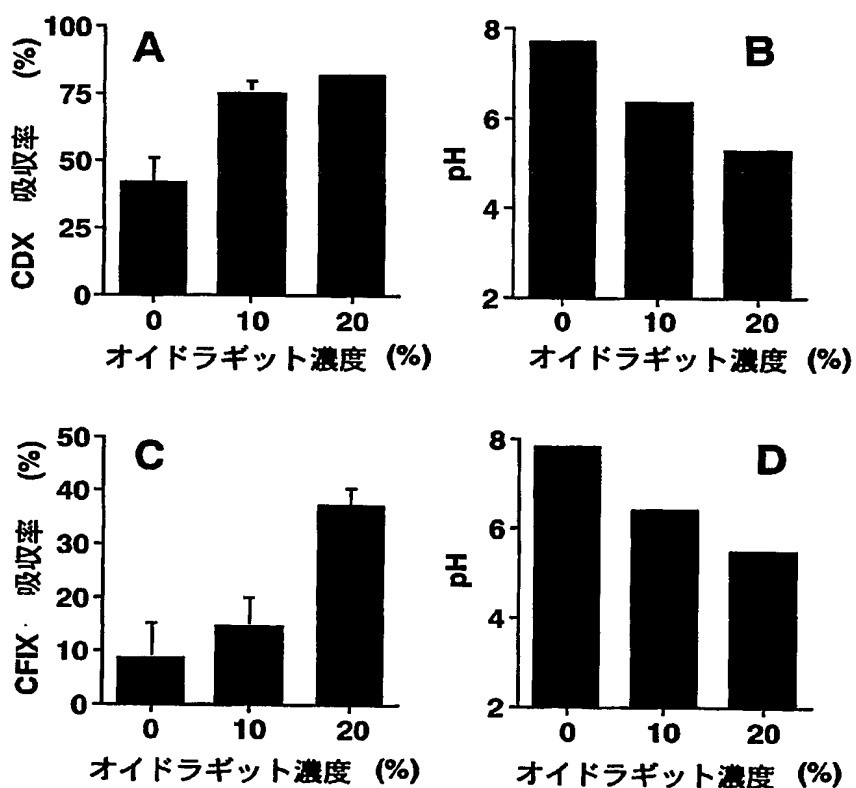


【図 2】

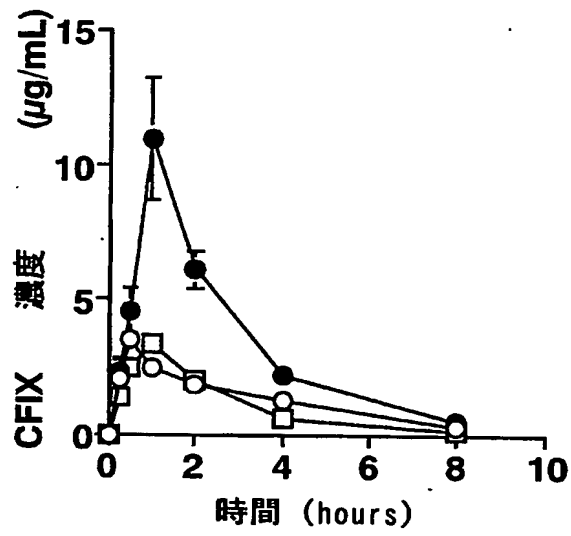


各値は 3 つの実験の平均 ± 標準誤差を表す

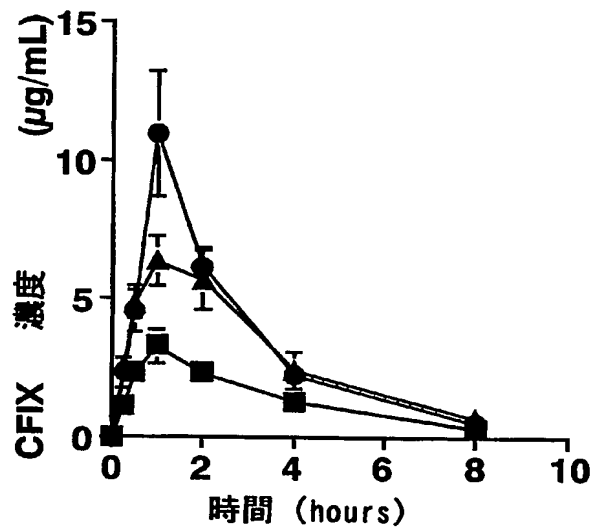
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、医薬品化合物の消化管での吸収を改善し、経口投与等において十分な治療効果が期待できる血中濃度が得られる医薬製剤、及びその製法を提供する。

【解決手段】 プロトン駆動型トランスポーターに認識される化合物と、該プロトン駆動型トランスポーターにおける該化合物の消化管内での至適細胞内取り込み pH とするのに足る量の pH 感受性高分子とを含む、消化管での吸収性が良好な製剤等に関する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 0 6 0 0 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 7 1 3 1 5 2 1]

1. 変更年月日	1 9 9 7 年 9 月 1 2 日
[変更理由]	新規登録
住 所	石川県金沢市長町 1 - 3 - 1 0
氏 名	辻 彰

特願 2 0 0 3 - 0 0 6 0 0 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 2 0 6 9 5 6]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 7 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区神田司町 2 丁目 9 番地
氏 名	大塚製薬株式会社